

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-293372

⑬ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)12月24日

A 23 L 2/38
 C 12 N 1/20
 // A 23 C 9/13
 (C 12 N 1/20
 C 12 R 1:01)

J-7235-4B
 7115-4B
 8114-4B

審査請求 未請求 発明の数 3 (全11頁)

⑮ 発明の名称 非アルコール性穀物飲料、その製造方法およびその製造に用いる微生物

⑯ 特 願 昭61-83217

⑰ 出 願 昭61(1986)4月10日

優先権主張 ⑱ 1985年4月10日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P3512814.3

㉑ 発 明 者 ベルナー・バツク ドイツ連邦共和国、バイテルシュタット、デイー 6108、
 アイベンベック、3・アー

㉒ 出 願 人 デーラー・ジー・エ ドイツ連邦共和国 ダルムシュタット、デイー 6100、リ
 ム・ビー・エツチ ートシュトラッセ、7-9

㉓ 代 理 人 弁理士 柳川 泰男

明 細 書

1. 発明の名称

非アルコール性穀物飲料、その製造方法

およびその製造に用いる微生物

2. 特許請求の範囲

1. 発酵により生成した乳酸を含むことを特徴とし、任意にホップ風味が付され、香りが付され、または甘みが付され、あるいは任意に炭酸を含むこともある非アルコール性穀物飲料。

2. 上記飲料に含まれる乳酸が主にL(+)-乳酸であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の飲料。

3. 不快な味を有する代謝副産物を含まず、特にジアセチルまたはアセトインをほとんど含まないことを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の飲料。

4. 穀物として大麦の麦芽を用いたことを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の飲料。

5. 穀物として大麦の麦芽を用いたことを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の飲料。

6. 穀物のマイシェを乳酸菌のみを用いて発酵させることを特徴とする非アルコール性穀物飲料の製造方法。

7. 穀物として大麦の麦芽を用いることを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の製造方法。

8. 発酵性飲料に用いるのに無害なベディオコッカス・デキストリニカス種の菌株を乳酸菌として用いることを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の製造方法。

9. 発酵性飲料に用いるのに無害なラクトバチルス・デルブリュック種の菌株を乳酸菌として用いることを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の製造方法。

10. 代謝の主要産物としてL(+)-乳酸を生成し、不快な味を有する代謝副産物を生成せず、特にジアセチルまたはアセトインをほとんど生成しないベディオコッカス・デキストリニカス種の菌株を乳酸菌として用いることを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の製造方法。

11. 発酵させたマイシェを次いで煮立たせ、

任意にホップ風味が付して、冷却し、そして固形分から分離および精製化したのち、任意に香りを付し、甘みを付し、あるいは二酸化炭素を加えることを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の製造方法。

12. 乳酸を含む麦芽汁を任意に二酸化炭素で洗浄した後、濃縮調整して水で再希釈される濃縮液とすることを特徴とする特許請求の範囲第8項記載の製造方法。

13. 菌株B1005(DSM3283)またはB1015(DSM3284)を乳酸菌として用いることを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の製造方法。

14. エキス分を6乃至14%含む麦芽汁調整液を用い、かつ発酵温度が8℃乃至50℃の温度範囲内であることを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の製造方法。

15. 実質的にL(+)-乳酸のみを生成し、不快な味を有する代謝副産物を生成せず、シアセチルまたはアセトインをほとんど生成しないべ

が付され、あるいは任意に炭酸を含むこともある飲料に関する。さらに、本発明はこれらの飲料の製造方法、およびその製造に用いる菌株にも関する。

[発明の背景]

非アルコール性穀物飲料としては、アルコール分を二次的に除去したビール類が知られている。ドイツ連邦共和国等において、上記飲料が『非アルコール性ビール(alkoholfreie Biere)』と称するためには、上記処理においてアルコール分を容量0.5%未満に減少させることが必要である。

様々な種類の果実や野菜の貯蔵に、乳酸菌と乳酸発酵が使用されていることは公知である。さらに、酵母と乳酸菌の混合発酵も『ハイスビール(Weissbier)』(小麦と大麦の混合マイシエから作られる)等の製造において知られている。さらに、乳酸発酵を用いてマイシエを酸性化し、実用化されている酸性酵母発酵の材料とすることも知られている。これまでのところ、麦芽または他の穀物を原料とするマイシエの純粋な乳酸発酵

ディオコッカス・デキストリニカス種の培養菌株。

16. デキストリンを唯一または主な炭素源として含む自然発酵中の穀物培地から乳酸菌を求め、桿菌を除きながら寒天培養培地上での数回の選択操作で四分子体を形成する球菌を分離し、そして実質的にL(+)-乳酸のみを生成し、不快な味を有する代謝副産物を生成せず、かつホップを添加しない麦芽汁中で成長可能な四分子体形成性菌をさらに培養する方法により得られたことを特徴とする特許請求の範囲第15項記載の培養菌株。

17. ペディオコッカス・デキストリニカス種の菌株B1005(DSM3283)またはB1015(DSM3284)。

3. 発明の詳細な説明

[発明の分野]

本発明は非アルコール性穀物飲料に関する。より詳しくは、本発明は麦芽を原料として任意にホップ風味が付され、香りが付され、または甘み

は実用化されていない。すなわち、既に公知で工業的に利用されている乳酸菌はいずれも、様々な種類の好ましくない代謝主産物および代謝副産物を生成するため、その生産物が食用には適さないものとなるからである。

[発明の要旨]

新規な非アルコール性穀物飲料を提供すること、より詳しくは、麦芽を原料とし乳酸発酵により得られる飲料であり、任意にホップ風味が付され、香りが付され、または甘みが付され、あるいは任意に炭酸を含むこともあり、かつ不快な味を有する物質を含まない飲料を提供することは、重要な研究の対象であった。そのためには、穀物のマイシエ、特に麦芽汁中における成長速度が速く、かつその中に主に含まれる炭素源、すなわちデキストリンを急速に発酵させることができる乳酸生成性の細菌株を見出すことが第一の課題である。また、人体にとって生理的な物質であるL(+)-乳酸のみが生成されるか、あるいは少なくともL(+)-乳酸が主に生成されることが

好ましい。ただし、その中には、その味に影響を与え、また麦芽汁の風味にそぐわない代謝副産物、特にジアセチルまたはアセトインが存在しないことが重要である。

ところで、ペディオコッカス・デキストリニカス (*Pediococcus dextrinicus*) 種の個体培養株が純粋培養で得られ、この培養株は上記本発明の目的の全てに適合していることが明らかとなった。ペディオコッカス・デキストリニカス種は、最近同定され、独立種として記載された [ダブリュー・バック (W. Back)、インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムチック・バクテリオロジー (Int. J. Sys. Bacteriol.)、28、1978、523～517頁]。さらに、本発明に従う使用が可能な二種類の菌株、B1005およびB1015が単離された。上記菌株は、ドイツ国の微生物寄託当局 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen、本明細書においてはDSMと略す) に受託番号3283および3284で、それぞれ寄託された。基本的には、ペディオコッカ

とが重要である。

本発明の飲料の製造方法は、大麦の麦芽を用いる場合、一般に通常の方法で発芽処理および処理を行ない製造された麦芽汁を原料とする。使用する麦芽汁中に含まれるエキスの比率は、一般に5乃至20%であり、また8乃至14%とすることが好ましい。上記範囲より含有率が低い場合には、飲料自体も非常に薄いものとなる。一方、含有率が高い場合には、製品が不必要に高価なものとなり、また製造時の処理操作が困難となる。二次汚染を回避するため、二酸化炭素雰囲気下に密封された発酵容器中、または二酸化炭素の連続的な置換下で操作を実施することが好ましい。発酵温度は、一般に約8℃乃至50℃の温度範囲内である。最も好ましい発酵温度は、約30℃乃至40℃である。生成された乳酸によって、最終的なpHは、3.5乃至4.1に調整される。pHの大幅な低下は、菌の成長を阻害する。従って、使用した菌類、デキストリンおよび澱粉を可能な限り利用して発酵させるためには、pHの値を4.

ス・デキストリニカス種の全ての菌株、およびラクトバチルス・デルブリュック (*Lactobacillus delbrueckii*) 種等の他のいくつかの乳酸菌の個体は、前述した条件を満たす限り、本発明に従う飲料およびその製造方法に適用することができる。

本発明は、発酵により生成した乳酸を含むことを特徴とし、任意にホップ風味が付され、香りが付され、または甘みが付され、あるいは任意に炭酸を含むこともある非アルコール性飲料を提供するものである。上記飲料に含まれる乳酸は、主にL(+)-乳酸であることが好ましい。さらに、好ましくない風味を有する代謝副産物を含まず、特にジアセチルおよびアセトインを含まないことが特に好ましい。

【発明の構成】

本発明において、穀物としては大麦の麦芽が主に用いられるが、小麦、米、雑穀等の他の穀類も、発芽状または未熟果の状態を用いることができる。上記穀類のマイシェが炭素源として主にデキストリンを含み、乳酸菌により発酵され得るこ

5乃至4.0に緩衝する方法が有効である。発酵後に残るエキス分、特にその中に存在する菌類、デキストリンおよび澱粉の残存状態は、発酵条件 (特に発酵温度、pH値、気体の雰囲気および麦芽汁の性質) および使用した菌株に依存する。例えば、発酵初期における菌の分離、あるいは煮沸により、発酵の進行を停止させて、残存する菌分の含有量が高い液を得ることができる。もちろん、以上のようにして得られた発酵液は、発酵可能な菌分をほとんど残していないものと比較して、容易に汚染されることも確かである。

発酵させた麦芽汁は、次いで煮立たせることが好ましい。煮沸後、任意にホップ風味を付すこともできる。このための具体的手段としては、通常発酵あるいは醸造方法における処理操作を用いることができる。次いで行なう固形分 (おり) およびホップの沈降処理も公知の方法により実施される。そして、粗大な固形分の粒子および細胞は、沈殿、濾過あるいは遠心分離により分離される。

飲料に二酸化炭素を加える場合は、直前に急冷することが好ましい。冷却することにより、飲料中の二酸化炭素の容量を増大させ、かつ固形分の発生を抑制することができる。任意に二酸化炭素で洗淨する工程を実施することは、味覚上においても有利である。次いで再度行なう濾過および撈詰は、通常の発酵あるいは醸造方法における処理操作に従い実施できる。撈詰の直前に任意に飲料に香りが付されてもよい。例えば、圧力タンク中に芳香成分を注入して行なうことができる。本発明に従う飲料の味をまろやかにするため、甘みを付すことも原則として可能である。例えば、ブドウ糖または果糖のシロップを加えることにより、甘みを付すことができる。

二酸化炭素で洗淨した後、蒸発装置を用いて果汁の濃縮する通常の方法に従い、乳酸を含む麦芽汁を濃縮する方法は、本発明の飲料の製造方法の有利な態様の一つといえる。上記方法により、濃縮液の生物学的な安定性が向上する。そして、上記濃縮液は、必要に応じて通常の撈詰装置におい

飲料を製造することもできる。

本発明の飲料の製造方法の特に有利な点として、従来のビール醸造施設およびソフト・ドリンク製造設備の利用が可能であることを挙げることができる。これは、本発明に従い用いる菌株が、ビールに対しても、またソフト・ドリンクに対しても、無害であるからである。従って、本発明の飲料の製造方法は、ハイスビール（小麦と大麦の混合マイシェから作られるビール）のような混合発酵、および精製した麦芽汁（第一麦芽汁：Vorderwürzen）の酸性化処理等にも基本的に適用することができる。

前述した新規な菌株の利用は、非アルコール性飲料の調製において特に有利である。本発明に従う飲料の製造方法において、不活性な気体の雰囲気下に密閉された発酵容器中で処理操作を実施することが好ましい。すなわち、上記のような処理により、芳香成分に対する酸素の悪影響および好気性細菌による二次汚染を回避することができる。

で、水で再希釈することができる。再希釈後、さらに別の濾過処理を必要とする場合がある。これは、濃縮により沈殿した蛋白質成分を除去するためである。本発明の飲料は、再希釈において再度、香りが付され、甘みが付され、あるいは炭酸を加えてもよい。

本発明の飲料は、アルコールを生成しない菌株を用いるため、アルコール分を含まない。純粋培養を行ない、かつ二次汚染を回避するならば、本発明の飲料はアルコール分を含まないソフト・ドリンクとなる。本発明の飲料のアルコール分は、ドイツ連邦共和国の食品法の非アルコール性飲料の規定範囲内（アルコール分が容量の0.5%未満）であり、さらに科学的な意味においても本発明の飲料はアルコール分を含まない（アルコール分は0%である）。もちろん、本発明の飲料を通常のビールと混合し、各地の飲料に関する法令の許容する範囲内で、アルコール分の少ないビールを得ることも可能である。また、本発明の飲料を用いて、いわゆる『シャンディ・タイプ』の混合

本発明の飲料の製造において、いわゆる並行処理を行なうことが好ましい。並行処理とは、すなわち、発酵した麦芽汁の20乃至30%を汲み出し、別の容器に移して、次の仕込みの接種材料にすることを意味する。このようにして、培養条件の更新が常時行なわれ、対象増殖期が維持される。さらに上記処理は、発酵速度を速め、また好ましくない微生物の汚染の危険性を減少させる。

以上のような発酵処理において、麦芽糖、麦芽三糖、デキストリン、さらに菌株の要求性に適合した場合は澱粉も発酵させることができ、いずれも代謝の主産物として $\text{L}(+)$ -乳酸が生成する。本発明の飲料およびその製造方法においては、穀物のマイシェ中、特に麦芽中において好んで増殖し、不快なあるいは飲料の風味にそぐわない味を有する代謝副産物を生成せず、特にジアセチルまたはアセトインをほとんど生成しない菌株が特に適している。味覚閾を越える量で、他の様々な有機酸、アルコール、エステル、ケトン等を生成する発酵も、一般に好ましくない。

本発明の飲料の味をビールと類似したものとするためには、ホップを加えて煮立たせることが好ましい。上記煮沸は、通常のビール醸造工程と異なり、発酵直後に実施する方が効果的である。本発明の飲料の製造方法は、一容器毎に実施してもよいし、連続的に実施してもよい。本発明に従う製造方法の好ましい態様のフロー・チャートを、第1図に詳細に示す。第1図における参照数字は、それぞれ以下の意味を有する。

- 1 : 麦芽貯蔵所
- 2 : 麦芽汁製造工程
- 3 : 発酵器
- 4 : 醗の懸濁液
- 5 : 煮沸処理
- 6 : 冷蔵
- 7 : 沈降処理および粗大物の濾過
- 8 : ホップの添加
- 9 : 煮沸処理
- 10 : 固形分およびホップの沈降処理
- 11 : 急冷装置

の沈降処理が必要となる。12の二酸化炭素による洗浄および/または13の二酸化炭素の飽和化を行なう場合は、その前段階として11の急冷処理を実施することが適当である。本発明の飲料は18の樽詰の前に、任意に濾過(14)および香料の添加(15)を実施してもよい。

本発明の飲料の製造方法の一態様として、工程17に従う濃縮液および工程18の水による再希釈を経由して得られた生成物に、公知の方法により再度工程14および16の処理を実施してもよい。上記工程14および16の再実施の前後で、二酸化炭素の飽和化(13)および香料の添加(15)を再度実施してもよい。

第1図のフロー・チャートから明らかなように、本発明の飲料の製造方法は、各工程自体は公知である通常の数工程からなるものである。従って、上記各工程はビール醸造所、ソフト・ドリンク製造工場および樽詰施設等の機材および装置を用いて実施することができる。ただし、本発明に用いる醗は、ホップを加えていない麦芽汁の発

- 12 : 二酸化炭素による洗浄
- 13 : 二酸化炭素の飽和化
- 14 : 濾過
- 15 : 香料の添加
- 16 : 樽詰所
- 17 : 蒸発による濃縮
- 18 : 水による再希釈

以上述べたうち、本発明において基本的に必要な工程は、1、2、3、4、7、9および16である。工程5における麦芽汁の煮沸は、滅菌処理および4の醗の懸濁液の保存増地の調整を目的として実施される。処理を一容器毎に実施する必要がある場合、および連続的な処理の実施を中断する必要がある場合には、6の冷蔵の実施が適している。

工程8において任意に実施するホップの添加は、本発明の飲料の味をビールと類似したものとし、さらに二次汚染の危険性を顕著に減少させる利点を有する。ホップを工程9の煮沸処理の後に添加する場合は、工程10の固形分およびホップ

酵だけが可能であるため、上記従来の製造工程のうちいくつかの順序は変更する必要がある。

本発明の飲料は、製造条件に従い、様々な濃度および味を有するものとして行うことができる。本発明の飲料は、天然の原材料のみを用いて得られる場合においても、様々な広い適用形態を見出すことができる。特に好ましい態様として、ホップを添加することにより、ビールと類似した形質を与えたものを挙げることができる。ただし、いずれの態様においても、本発明の飲料は有効成分を含む非アルコール性飲料と認められる。

以下の各例において、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[第1例]

ペディオコッカス・デキストリニカス種の醗の生産

唯一の炭素源としてデキストリンを含む栄養増地に、十分に嫌気的な条件下にある様々な液体増地中から採取した増殖部分を接種し、乳酸菌を収

集する。寒天培養地を用いる公知の選択操作により、四分子体を形成する球菌を、桿菌が存在する場合はそれを分離しながら単離する。以上のようにして得られる四分子体形成性種の各コロニーを培養し、それを接種材料としてホップを含まない麦芽汁中に移植する。発酵中の各バッチについて、最初にL(+)-乳酸の存在を検出し、そしてラセミ体乳酸およびD-乳酸を生成する全ての菌株を除く。そして、L(+)-乳酸のみを生成する菌株について感覚器官による検査を実施し、不伏な味、特にジアセチルまたはアセトインの存在によるものを有する全ての菌株をさらに除く。このようにして得られるペディオコッカス・デキストリニカス種の菌株は、原則として本発明の使用に適している。後述する第1表において、ペディオコッカス・デキストリニカス固有の形質について、ペディオコッカス属の他の種と比較しながら列挙する。なお、第1表において使用する記号は以下の意味を有する。

- : 陰性反応

- 1 : リボース発酵
- 2 : マルトース発酵
- 3 : ラクトース発酵
- 4 : メレチトース発酵
- 5 : デキストリン発酵
- 6 : アルギニン分解
- 7 : 35℃における増殖
- 8 : 40℃における増殖
- 9 : 48℃における増殖
- 10 : NaClが5.5%存在する条件での増殖
- 11 : NaClが6.5%存在する条件での増殖
- 12 : NaClが8.0%存在する条件での増殖
- 13 : NaClが15%存在する条件での増殖
- 14 : pH4.3における増殖
- 15 : pH7.5における増殖
- 16 : pH8.0における増殖
- 17 : pH9.0における増殖
- 18 : 乳酸の立体配置
- 19 : 電気泳動におけるD-乳酸デヒドロゲナーゼ(D-LDH)の移動性(平均移動値)

+ : 陽性反応

± : 反応が変動的

() : わずかな反応

また、ペディオコッカス属の各種の名称については、以下の数字を用いて略す。

- (1) : ペディオコッカス・ペントサセウス
(*Pediococcus pentosaceus*)
- (2) : ペディオコッカス・アシディラクティシ
(*Pediococcus acilactici*)
- (3) : ペディオコッカス・パルブルス
(*Pediococcus parvulus*)
- (4) : ペディオコッカス・イノピナツス
(*Pediococcus inopinatus*)
- (5) : ペディオコッカス・ダムノスス
(*Pediococcus damnosus*)
- (6) : ペディオコッカス・デキストリニカス
- (7) : ペディオコッカス・ハロフィルス
(*Pediococcus halophilus*)

さらに、第1表における検査項目を示す数字は、以下の意味を有する。

- 20 : 電気泳動におけるL-乳酸デヒドロゲナーゼ(L-LDH)の移動性(平均移動値)
- 21 : FDPにより活性化するL-LDH
- 22 : DNA中のG+C含量(モル%)

第1表(その1)

項 ペディオコッカス No :

目 (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7)

1	+	+	-	-	-	-	+
2	+	-	(+)	+	+	+	+
3	(+)	(+)	-	+	-	±	±
4	-	-	-	-	(+)	-	(+)
5	-	-	±	±	(+)	+	(+)
6	+	+	-	-	-	-	+
7	+	+	+	+	-	+	+
8	+	+	(+)	(+)	-	+	(+)
9	-	+	-	-	-	-	-

第1表(その2)

項 ペディオコッカス No.:

目 (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7)

10	+	+	+	+	-	+	+
11	+	+	(+)	(+)	-	-	+
12	+	+	(+)	(+)	-	-	+
13	-	-	-	-	-	-	+
14	+	+	+	+	+	±	-
15	+	+	(+)	+	-	+	+
16	+	+	-	-	-	+	+
17	-	-	-	-	-	-	+
18	DL	DL	DL	DL	DL	L(+)	L(+)
19	1.23	1.29	1.42	1.36	1.16	-	-
20	1.36	1.39	0.97	1.18	0.92	1.02	0.82
21	-	-	-	-	-	+	-
22	38	42-44	40-41	39	38	40	34-36

(9): NCDO1560

(10): NCDO1247

(11): B1005 (DSM3283)

さらに、第2表における検査項目を示す数字は、以下の意味を有する。

- 1: 麦芽汁中における増殖
- 2: フォーゲス-ブロスカウアー試験
- 3: 43℃における増殖
- 4: 45℃における増殖
- 5: pH 4.5における増殖
- 6: NaClが6%存在する条件での増殖
- 7: リボース発酵
- 8: トレハロース発酵
- 9: サッカロース発酵
- 10: ラクトース発酵
- 11: 蜜粉発酵
- 12: イヌリン発酵
- 13: α-メチル-グルコシド発酵

寄託した菌株に関する記述

後述する第2表において、入手可能なペディオコッカス・デキストリニカス種の変異株の形質について列挙する。なお、第2表において使用する記号は以下の意味を有する。

+: 陽性反応

-: 陰性反応

s: 遅い反応または弱い反応

また、ペディオコッカス・デキストリニカス種の各菌株の名称については、以下の数字を用いて略す。

(1): DSM2033 = ATCC33087

(2): NCDO1249, BS8a

(3): DSM20293, B150a,

B151b, B371a

(4): S2a, S2b

(5): S14a

(6): BS1b, BS7a

(7): T3a, T3c

(8): T5a

第2表

項 ペディオコッカス・デキストリニカス No.:

目 (1)(2)(3)(4)(5) (6)(7)(8)(9)(10) (11)

1	s	s	s	s	+	s	s	s	s	s	++
2	-	-	-	-	-	s	-	-	+	s	-
3	+	+	s	+	+	s	+	+	+	+	-
4	-	s	-	-	-	-	s	-	+	-	-
5	s	-	+	s	+	s	s	-	s	s	+
6	+	+	+	s	s	s	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	s	-	-
8	s	-	-	-	-	-	s	+	-	+	-
9	s	-	+	s	s	-	+	+	s	+	s
10	s	+	-	+	+	-	-	s	+	s	-
11	+	+	+	+	+	+	s	+	s	+	+
12	s	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
13	s	s	+	-	s	s	+	-	s	+	+

ベディオコッカス・デキストリニカス
B 1 0 1 5 (D S M - 3 2 8 4) に関する詳細な記
述

上記菌体は、以下の理由によりベディオコッカス属に属する：

四分子体を形成する球菌である；移動性がない；カタラーゼ活性がない；ベンジジン試験に陰性である；胞子を形成しない；条件的な嫌気性である；主な代謝産物が乳酸である（95%以上が乳酸として存在する；ホモ乳酸発酵）。

さらに上記菌体がベディオコッカス・デキストリニカス種に属すること、および他の公知のベディオコッカス属の菌と上記菌種との違いは、前述した第1表に列挙した形質によるものである。

菌株 B 1 0 1 5 と他の入手可能なベディオコッカス・デキストリニカス種の菌株との相違点は、第2表に示される結果から明らかである。発酵技術において重要な相違点として、B 1 0 1 5 は麦芽汁中、および低い pH (4.4) における増殖能力が高いことを挙げることができる。これに對

孔部分で増殖する)；

8℃乃至40℃において増殖する；至適温度は30℃乃至35℃である；45℃以上では増殖が認められない；NaClは6%が許容限度量である；pH 4.7乃至8.3において増殖する；pH 4.0において、およびpH 8.6においては増殖しない；MRSブイヨンにおけるpH値をpH 3.5乃至4.3に低下させる；硝酸還元性、ゼラチンの液化能、ウレアーゼ活性、アルギニン分解能、馬尿酸分解能、およびグルコースまたはマルトース発酵における気体発生については、いずれも陰性である。

上記菌はホモ乳酸発酵性であり、グルコースの代謝主産物としてL(+)-乳酸を生成する。上記菌は以下の炭素源から乳酸を生成する：

グルコース；フルクトース；マンノース；ガラクトース；マルトース；セロビオース；麦芽三糖；デキストリン；澱粉（幾分遅い）；サリシン；アミグダリン；およびグルコン酸ナトリウム（幾分遅い）。

して、他の菌株の多くは上記条件下において全く増殖しないか、あるいは弱い増殖能力しか示さない。

B 1 0 1 5 は、以下の形質については他のデキストリニカス種の菌株と同様である：

細胞の直径は0.8乃至1.1μmである；細胞は、単独状態としても、一対の状態としても、四分子体としても、あるいは大きな集合体としても存在し、しばしば短い鎖状でも存在する；MRS-寒天培地上のコロニー〔マン・ジュイ・シー・ド(Man, J. C. de)、エム・ロゴサ(M. Rogosa) およびエム・イー・シャープ(M. E. Sharpe)、ジャーナル・オブ・アプライド・バクテリオロジー(J. Appl. Bacteriol.)、23、130~135、1960〕は、平ら乃至は中央部がやや盛り上がり、円形であり、不透明で、光沢があり、白っぽい；また、上記コロニーの直径は0.5乃至2.5mmである；粘液を生成しない；好氣的条件下においても、嫌氣的条件下においても増殖が認められる（穿刺培養において全穿

以下の炭素源からは乳酸を生成しない：

アラビノース；キシロース；ラムノース；ソルボース；メリビオース；メレチトース；ラフィノース；グリセロール；マンニトール；ソルビトール；メソ-イノシトール；メソ-ダルシトール；キシリトール；アドニトール；エリスリトール；およびガラクトロン酸。

L-乳酸デヒドロゲナーゼは特異性を有し、フルクトース-1,6-二磷酸(FDP)により活性化する。DNA中のG+C含量は40モル%である。

前述した形質の検査方法

乳酸の立体配置：

乳酸の立体配置は、光学検査において立体特異性を有する乳酸デヒドロゲナーゼを用いて決定した〔ホホースト・エイチ・ジュイ(Hohorst, H. J.)：酵素分析法(Methoden der enzymischen analyse)に記載のL-乳酸測定法(L-lactatbestimmung)参照、エイチ・ユー・ベルグマイヤー(H. U. Bergmeyer)、266~270、ペイン

ヘイム(Weinheim), 1966]。

FDPによるL-LDHの活性化:

L-LDHは、粒子が遊離状態にある細胞のホモジネートを用いて検査した。当量までL-乳酸およびコエンザイムI(ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド=NAD⁺)を加え、NADの減少に伴う366nmの吸光度の変化を測定した[前述したホホスト〜を参照]。さらにFDPの添加による反応速度の影響を調べた[ド・フリース(De Vries)、ダブリュー・カプティン(W. Kapteign、ダブリュー・エム・シー・バン・デル・ピーク(W. M. C. Van der Beek)、イー・ジーおよびエイ・エイチ・スタウトハーマー(E. G. und A. H. Stouthamer): バッチ培養および連続培養におけるラクトバチルス・カゼイL3のモル増殖収量および発酵収支(Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures) 参照、ジャーナル・オブ・ジュネティック・マイクロバイオロジー(J. Gen. Micro-

細胞中のデオキシリボ核酸に占めるグアニン(G)およびシトシン(C)の含量は、平均融解温度により決定した[マーナー・ジェイ(Marnur, J.)およびドティー・ビー(Doty, P.): 熱変性温度によるデオキシリボ核酸の塩基組成の決定(Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature) 参照、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 5, 109, 1962]。上記検出の誤差の範囲は±1%である。

増殖検査:

様々な温度における増殖は、MRSブイヨン中に4日間インキュベートしたのを確認した[マン・ジェイ・シー・ド(Man, J. C. de)、ロゴサ・エム(Rogosa, M.)およびエム・イー・シャープ(W. E. Sharpe)、ジャーナル・オブ・アプライド・バクテリオロジー(J. Appl. Bact.), 23, 130~135, 1960]。塩分に対する耐性は、MRSブイヨン中にNaClを加えて、Na

biol.), 63, 333~345(1979)]。

電気泳動におけるL-LDHの移動性:

粒子が遊離状態にある細胞の粉砕液を用いて、ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動により検査した[ステッター・ケー・オー(Stetter, K. O.): (Physiologisch-biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäureisomerenmischungen bei *Lactobacillen*) 参照、学位論文(T. U. München S.), 44~55, 1973]。

ペプチドグリカンの類型:

細胞壁中のアミノ酸組成をシュレイファー(Schleifer)およびカントラー(Kandler)の方法に従い決定した[シュレイファー・ケイ・エイチおよびオー・カントラー: 細菌の細胞壁のペプチドグリカンの類型、およびその分類学上における意味(The peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications) 参照、バクテリオロジー・レビュー(Bacteriol. Rev.), 36, 407~477, 1972]。

DNA中のG+C含量:

CとG濃度において決定した。各pH値における増殖検査においては、MRSブイヨン中にNaOHまたはHClを加えてそれぞれのpH値に調整した。

各炭素源の発酵:

様々な炭素源の存在下における発酵状態は、MRSブイヨンに含まれるグルコースを前述したような糖類、多糖類、糖アルコール、および有機酸にそれぞれ置き換えて検査した。クロロフェノール・レッドを酸性化指示薬として使用した。

生理学的な検査は、[ダブリュー・バック(W. Back): (Zur Taxonomie der Gattung *Pediococcus*), ブラウビッセンシャフト(Brauvisenschaft) 31, 1978, 237~250頁]に従い実施した。

第2図は、MRSブイヨン中における上記微生物の外観を約1300倍に拡大して示すものである。

〔第2例〕

ホップ風味が付された飲料の製造

通常の発芽処理により得られる大麦芽芽を、ビール製造所において通常の麦芽汁製造工程にかける。このようにして、エキス分を11%含む第一麦芽汁（濾過し、精製した麦芽汁）を調製する。そして、菌株B1015（対数増殖期）を接種材として20乃至30%、発酵温度35℃、攪拌下、CO₂ガスを吹きこみながら接種する。約36時間後、ホップを加えた煮沸を2時間実施する。上記ホップの使用量は、最終的に飲料中に約25mg/lのα-酸が残る範囲の量から選択する。そして混合物を5℃に冷却し、通常の方法により珪藻土または濾過層を用いて濾過し、5g/lの二酸化炭素を用いて炭酸化し、そしてブレッシャー・タンク中で天然ビール香料を1:1000および果糖シロップを2.5%混合して樽詰する。以上のようにして、爽快な味と少し刺激性的な酸味を有する飲料が得られる。上記飲料は、ビールに類似しているが、アルコール分は

含まれていない。

〔第3例〕

大麦芽芽と原料穀類を1:1の比率で混合し、エキス分を10%含む第一麦芽汁（濾過し、精製した麦芽汁）を調製する。そして菌株B1015を接種材として第2例と同様に接種し、約40時間攪拌する。第2例と同様にホップを添加して2時間煮沸する。上記ホップの使用量は、最終的に飲料中に約20mg/lのα-酸が残る範囲の量とする。そして混合物を5℃に冷却し、珪藻土または濾過層を用いて濾過する。そして、5g/lの二酸化炭素を用いて炭酸化し、果糖シロップを4%加えて甘みが付され、ハーブおよび柑橘系の香味料の混合物を加え、さらにこの混合飲料を樽詰する。また、上記飲料の別のサンプルにビルゼンタイプのビールを20%混合すると、アルコール分を0.5%含む飲料が得られる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の飲料の製造方法の好ましい態様を示すフロー・チャートである。

第2図は、MRSブイヨン中における本発明に用いる微生物の外観を約1300倍に拡大して示すものである。

- 1 : 麦芽貯蔵所
- 2 : 麦芽汁製造工程
- 3 : 発酵器
- 4 : 菌の懸濁液
- 5 : 煮沸処理
- 6 : 冷蔵
- 7 : 沈降処理および粗大物の濾過
- 8 : ホップの添加
- 9 : 煮沸処理
- 10 : 固形分およびホップの沈降処理
- 11 : 急冷装置
- 12 : 二酸化炭素による洗浄
- 13 : 二酸化炭素の飽和化
- 14 : 濾過
- 15 : 香料の添加
- 16 : 樽詰所
- 17 : 冷蔵による濃縮
- 18 : 水による再希釈

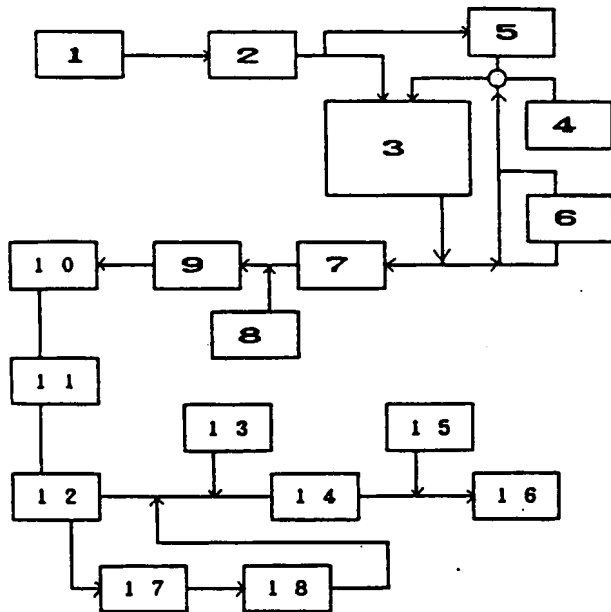
特許出願人 デーラー・

ジー・エム・ビー・エッチ

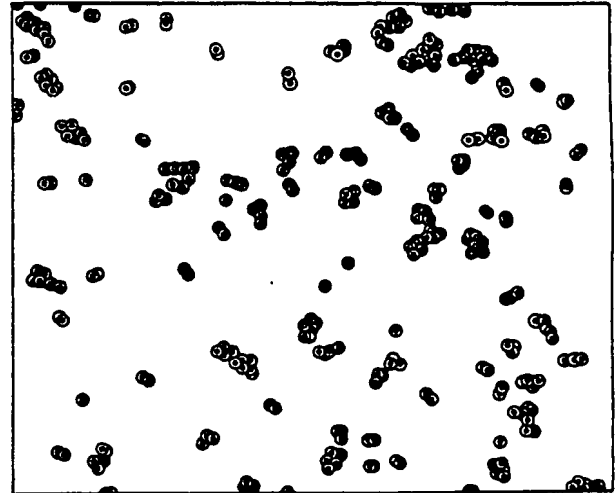
代 理 人 弁理士 柳 川 泰 男

図面の浄化(内容に変更なし)

第 1 図



第 2 図



手続補正書(方式)

昭和61年 7月15日

特許庁長官 宇賀 道郎 殿

1. 事件の表示

昭和61年 特許願 第83217号

2. 発明の名称

非アルコール性穀物飲料、その製造方法
およびその製造に用いる微生物

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 ドイツ連邦共和国、ダルムシュタット、
ディー6100、リートシュトラッセ、7-9
名 称 デーラー・ジー・エム・ビー・エッチ

4. 代理人

住 所 東京都新宿区四谷2-14ミツヤ四谷ビル8階
☎ (358)1798/9

氏 名 (7467)弁理士 柳 川 泰 男

5. 補正命令の日付 昭和61年8月24日 (発送日)

6. 補正により増加する発明の数 なし

7. 補正の対象 (1) 図面の簡単な説明

(2) 図面

8. 補正の内容 (1) 明細書の「図面の簡単な説明」の欄の第38頁
3行目の『ものである。』を『模式図である。』と補正する。

(2) 出願時に添付した第2図を別紙に添付した
第2図と差し換える。

